

# Spektrofotometrijsko određivanje željeza u farmaceutskom pripravku

---

Divić, Lucija

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:389856>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET U SPLITU**

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ŽELJEZA**  
**U FARMACEUTSKOM PRIPRAVKU**

**ZAVRŠNI RAD**

**LUCIJA DIVIĆ**

**Matični broj: 59**

**Split, rujan 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ŽELJEZA**  
**U FARMACEUTSKOM PRIPRAVKU**

**ZAVRŠNI RAD**

**LUCIJA DIVIĆ**

**Matični broj: 59**

**Split, rujan 2020.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY**  
**FOOD TECHNOLOGY**

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON**  
**IN A PHARMACEUTICAL**

**BACHELOR THESIS**

**LUCIJA DIVIĆ**

**Parent number: 59**

**Split, september 2020.**

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Tema rada** je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta  
**Mentor:** Prof. dr. sc. Josipa Giljanović  
**Pomoć pri izradi:** Mag. chem. Andrea Paut

### SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ŽELJEZA U FARMACEUTSKOM PRIPRAVKU

Lucija Divić, 59

**Sažetak:** Željezo je metal poznat i koristan čovjeku, kako u tehničkom smislu tako i u nutritivnom. Jedan je od važnih bioelemenata našeg organizma. Zaslužan je za opskrbu kisikom i normalno funkcioniranje organizma. Njegov nedostatak uzrokuje slabokrvnost ili anemiju, koja se može liječiti prehranom ili lijekovima. U ovom eksperimentalnom radu je opisano spektrofotometrijsko određivanje željeza u lijeku Tardyferon namijenjenom za liječenje anemije, koji je prethodno raščinjen u mikrovalnoj pećnici. UV/VIS spektroskopija je metoda koja se primjenjuje za određivanje nepoznate koncentracije uzorka pomoću Beerovog zakona. Mjerenje se vršilo u vidljivom području pri valnoj duljini 506 nm i kiseloj sredini pH=1.

**Ključne riječi:** željezo, Tardyferon, mikrovalno raščinjavanje, spektroskopija, Beerov zakon

**Rad sadrži:** 36 stranica, 13 slika, 2 tablice, 20 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

- |                                    |             |
|------------------------------------|-------------|
| 1. Izv. prof. dr. sc. Ante Prkić   | predsjednik |
| 2. Izv. prof. dr. sc. Vesna Sokol  | član        |
| 3. Prof. dr. sc. Josipa Giljanović | član-mentor |

**Datum obrane:** 15.9.2020.

**Rad je u tiskanom u elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 ( Ruđera Boškovića 35).

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.28.  
**Mentor:** Prof. dr. sc. Josipa Giljanović  
**Technical assistance:** mag.chem. Andrea Paut

### SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF IRON IN A PHARMACEUTICAL Lucija Divić, 59

**Abstract:** Iron is metal well known and useful for human, as in technical way and in nutritional way. It is one of important bioelement of our system. It is responsible for the oxygen supply and for the normal functioning of the organism. Its lack in organism causes anemia which can be treated with food or pharmaceutical. Spectrophotometric determination of iron in pharmaceutical Tardyferon which is intended to treat anemia, is described in this experimental work. Preparation is previously dissolved in microwave oven. UV/VIS spectroscopy is method which is used to determine an unknown sample concentration using Beer law. The measurement was performed in the visible range at the wavelength of 506 nm and acidic environment at pH=1.

**Keywords:** iron, Tardyferon, microwave dissolution, spectroscopy, Beer's law

**Thesis contains:** 36 pages, 13 figures, 2 tables, 20 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |    |                                     |              |
|----|-------------------------------------|--------------|
| 1. | Ph. D. associate prof. Ante Prkić   | chair person |
| 2. | Ph. D. associate prof. Vesna Sokol  | member       |
| 3. | Ph. D. full prof. Josipa Giljanović | supervisor   |

**Defence date:** 15.9.2020.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 35).





*Završni rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sr. Josipe Giljanović i nadzorom mag. chem. Andree Paut, u razdoblju od lipnja do rujna 2020.godine.*

*Želim se zahvaliti prof. dr. sc. Josipi Giljanović na mentorstvu te pruženoj pomoći prilikom izrade ovog završnog rada. Također se zahvaljujem mag. chem. Andrei Paut na posvećenom vremenu, savjetima i pomoći prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela rada.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na ogromnoj podršci i motivaciji tijekom obrazovanja.*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

1. Otopiti uzorak tablete Tardyferon mikrovalnom digestijom u mikrovalnoj pećnici
2. Pripremiti standardne otopine za baždarnu krivulju
3. Pripremiti uzorke Tardyferona različitih koncentracija za analizu
4. Spektrofotometrijski snimiti spektre otopina za analizu
5. S obzirom na izmjerenu apsorbanciju pripremljenih otopina, prema krivulji umjeravanja Beerovim zakonom izračunati stvarne koncentracije željezovih iona u Tardyferonu i usporediti ih s koncentracijom na deklaraciji lijeka.

## **SAŽETAK**

Željezo je metal dobro poznat i koristan čovjeku, kako u tehničkom smislu tako i u nutritivnom. Jedan je od važnih bioelemenata našeg organizma. Zaslužan je za opskrbu kisikom i normalno funkcioniranje organizma. Njegov nedostatak u organizmu uzrokuje slabokrvnost ili anemiju, koja se može liječiti prehranom ili farmaceutskim pripravcima. U ovom eksperimentalnom radu je opisano spektrofotometrijsko određivanje željeza u lijeku Tardyferonu namijenjenom za liječenje anemije, koji je prethodno raščinjen u mikrovalnoj peći. UV/VIS spektroskopija je metoda koja se primjenjuje za određivanje nepoznate koncentracije uzorka pomoću Beerovog zakona. Mjerenje se vršilo u vidljivom području pri valnoj duljini 506 nm i kiseloj sredini pri pH=1.

**Ključne riječi:** željezo, Tardyferon, mikrovalno raščinjavanje, spektroskopija, Beerov zakon

## **SUMMARY**

Iron is well known and useful metal for human, as in technical way and in nutritional way. It is one of important bioelement of our system. It is responsible for the oxygen supply and for the normal functioning of the organism. Its lack in organism causes anemia which can be treated with food or pharmaceutical preparations. Spectrophotometric determination of iron in pharmaceutical Tardyferon which is intended to treat anemia, is described in this experimental work. Preparation is previously dissolved in microwave oven. UV/VIS spectroscopy is method which is used to determine an unknown sample concentration using Beer law. The measurement was performed in the visible range at the wavelength of 506 nm and acidic environment at pH=1.

**Keywords:** iron, Tardyferon, microwave dissolution, spectroscopy, Beer's law

# SADRŽAJ

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.OPĆI DIO.....</b>	<b>2</b>
1.1.Željezo .....	2
1.1.1. Željezo kao kemijski element .....	2
1.1.2. Željezo kao bioelement .....	3
1.1.3. Tardyferon .....	4
1.2. Spektroskopija.....	6
1.2.1. Elektromagnetsko zračenje .....	6
1.2.2. Podjela spektroskopije .....	9
1.2.3. UV/VIS spektroskopija.....	10
1.2.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija.....	11
1.2.5. Molekulska apsorpcijska spektroskopija .....	12
1.2.6. Beerov zakon .....	14
1.3. UV/VIS molekulska apsorpcijska spektroskopija.....	17
1.4. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji .....	19
1.4.1. Vrste spektroskopskih instrumenata .....	20
1.5. Primjena UV/VIS spektroskopije.....	21
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>23</b>
2.1. Aparatura i kemikalije .....	23
2.2. Mikrovalna digestija.....	23
2.3. Priprema otopina za rad.....	25
2.4. UV/VIS mjerenje spektra .....	31
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>32</b>
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>36</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>37</b>

## UVOD

Željezo je kako tehnički najvažniji metal čovjeku, tako i nutritivno važan element u našem organizmu. Spada u grupu esencijalnih elemenata kojem je najvažnija uloga prijenos kisika te je odgovoran za normalno funkcioniranje organizma. Najčešća bolest vezana za željezo je slabokrvnost ili anemija koja se može tretirati ili ishranom ili farmaceutskim pripravcima. Jedan od pripravaka je Tardyferon čijim konzumiranjem tri do šest mjeseci se uspješno liječi anemija, te se koristi u ovom eksperimentalnom radu. Da bi se odredila koncentracija željeza u Tardyferonu koja je potrebna za liječenje anemije koristi se spektrofotometrijska metoda određivanja željeza koja se obrađuje u ovom radu. Lijek je pripremljen mikrovalnom digestijom kako bi se mogla provoditi daljnja spektrofotometrijska analiza koja koristi informacije o interakciji između tvari i zračenja. Dobivene koncentracije otopina određene su preko Beerovog zakona mjerenjem apsorpcije energije zračenja pri određenoj valnoj duljini ispitivane otopine sa serijom standardnih otopina. UV/VIS spektroskopija se koristi za određivanje koncentracije komfora i prisutnosti konformacijskih promjena molekula ako uslijed toga dolazi do promjene u apsorpcijskom spektru molekule. Koristeći spektroskopske metode analize u koje ubrajamo i UV/VIS dobivamo željene informacije o molekulama i njihovim svojstvima.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Željezo

### 1.1.1. Željezo kao kemijski element

Željezo je prijelazni metal koji uz nikal i kobalt pripada 8. skupini PSE, takozvanoj željeznoj trijadi. Za tu skupinu posebno je značajna pojava feromagnetizma koja se odnosi na uočavanje magnetizma čak i nakon prestanka djelovanja magnetskog polja. Razlog tomu je što atomi elemenata posjeduju jedan ili više nesparenih elektrona.<sup>1</sup>

Željezo je metal koji je od davnina poznat čovjeku te je postao najvažniji tehnički metal bez kojeg je današnji život nezamisliv. Elementarno željezo je mekano, srebreno-bijele boje i vrlo reaktivno. Upravo zbog velike reaktivnosti ga u prirodi ne nalazimo u elementarnom stanju jer vrlo lako oksidira i reagira sa sumporom.<sup>2</sup>

U prirodi se pojavljuje u obliku oksidnih, silikatnih, karbonatnih i sulfatnih ruda. Danas se za dobivanje željeza koriste samo oksidne (magnetit, hematit) i karbonatne (siderit) rude. Najpoznatija željezna legura je čelik.<sup>1</sup>

Neplemeniti je metal zbog negativnog elektrodnog potencijala. Posljedica toga je netopljivost u oksidirajućim kiselinama tvoreći zaštitni oksidni sloj. Zbog svog elektrodnog potencijala se otapa u otopinama metalnih iona kao zlata, srebra, platine, žive i drugih. Dobro je topljiv u neoksidirajućim kiselinama.<sup>2</sup>

U vlažnom zraku i vodi željezo je nestabilno. U tim uvjetima se odvija elektrokemijski proces hrđanja pri kojem se željezov(III) oksid hidratizira u  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . No, ukoliko u vodi nema otopljenog kisika ili je zrak suh proces hrđe se ne odvija.

Poznato je da željezo pravi spojeve stupnja oksidacije +2, +3 i +6. Ipak, najvažniji i najprisutniji spojevi su stupnja oksidacije +2, ionskog karaktera, i +3, kovalentnog karaktera. Stupnjevi oksidacije +2, +3 i +4 tvore mnoge kompleksne spojeve. Željezov (II) hidroksid nije topljiv u vodi i nestabilan je na zraku, zbog toga vrlo brzo oksidira do željezova(III) hidroksida.  $\text{Fe}^{2+}$  nema izražena redukcijska svojstva, te se njegove kisele otopine mogu skladištiti jako dugo vrijeme. S druge strane,  $\text{Fe}^{3+}$  ion je jako oksidacijsko sredstvo i u vodenim otopinama tvori akva-komplekse. No, u lužinama



obje vrste iona daju netopljive spojeve, bijeli talog  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  i hidratizirani  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  koji ima amfoterna svojstva. Željezov(II) oksid nema stehiometrijski odnos, jer uvijek sadrži ponešto  $\text{Fe}^{3+}$  iona zato jer lako oksidira.<sup>1</sup>

### 1.1.2. Željezo kao bioelement

Željezo je jako bitan element u našem organizmu. Osnovna mu je uloga transport kisika. Sastavni je dio hemoglobina, tvari koja daje boju crvenim krvnim stanicama.<sup>3</sup> Hemoglobin je bjelančevina koja sadrži dvovalentno željezo. Prolaskom kroz pluća dvovalentno željezo na sebe veže kisik i na taj način crvene krvne stanice donose tkivima i organima kisik, a odvodi ugljikov(IV) oksid. Također je važan u mišićnim stanicama, u kojim mioglobin prenosi kisik kako bi omogućio mišićne kontrakcije. Željezo pronalazimo i u nekim enzimima važnim za metabolizam bjelančevina kao što je DNK. Slobodni dvovalentni oblik može oksidirati u trovalentni oblik. Slobodan trovalentni oblik stvara slobodne radikale štetne za tkiva i organe.<sup>4</sup>

Potrebe organizma za željezom ovise o dobi i razvoju. Stoga je muškarcima potrebna manja količina željeza od žena koje su u reproduktivnoj dobi. U protivnom ako nije zadovoljena količina željeza smanjuje se sinteza hemoglobina i eritrocita.<sup>4</sup>

Apsorpcija se odvija u tankom crijevu kroz četiri sata nakon konzumacije. U organizmu se željezo pohranjuje u slezeni i jetri te čuva za ponovnu upotrebu. I pri tome se trovalentno željezo enzimima reducira u dvovalentno. Jedino se gubitkom krvi može izgubiti značajna količina željeza iz organizma. Čak 70% željeza pohranjeno je u hemoglobinu, a ostatak željeza potrebnog za sintezu eritrocita unosimo hranom. S obzirom da se samo 10% željeza apsorbira iz hrane, potrebe muškaraca za željezom su 10 mg, a žena 18 mg.<sup>3</sup>

Toksični učinci željeza se javljaju zbog njegovog prekomjernog nakupljanja u jetri, gušterači, srcu i drugim organima, te može uzrokovati prestanak rada tih organa što dovodi do smrti. To je rezultat poremećaja u genomu metabolizma zbog kojih probavni sustav nema mogućnost uklanjanja viška željeza iz organizma.<sup>4</sup> Poremećaj se naziva hemokromatoza.<sup>3</sup>

Anemija ili slabokrvnost je najčešća bolest uzrokovana nedostatkom željeza. Manjak željeza u organizmu smanjuje količinu hemoglobina u eritrocitima i količinu kisika u stanicama. Kao posljedica dolazi do nakuplja ugljikova(IV) oksida. Zbog manjka kisika u mozgu dolazi do vrtoglavice, umora, gubitka teka i bljedoće. Bolest se javlja zbog neadekvatnog unosa ili apsorpcije iz hrane, ogromnim gubitcima krvi i čestim infekcijama. Postoji više oblika anemije od kojih su neki nasljedni i ako se ne liječe mogu biti smrtni.<sup>4</sup> Često se javlja kod djece, žena u reproduktivnoj dobi i tijekom trudnoće.<sup>3</sup>

Može se liječiti konzumacijom farmaceutskih pripravaka ili hranom bogatom željezom. Hrana životinjskog podrijetla, meso, je bogat izvor željeza u obliku hema. Hem se jako dobro apsorbira za razliku od željeza anorganskog podrijetla koje je najčešće trovalentno. Trovalentno željezo je netopljivo u kiseloj sredini i teže se apsorbira, dok dvovalentnom pogoduje kisela sredina želuca za otapanje.<sup>3</sup>

Oralni farmaceutski pripravci su široke i jednostavne primjene te su jeftin način za liječenje anemije. Najčešće se koriste dvovalentne soli jer je dvovalentni oblik dobro topljiv i lako se apsorbira. Pozitivni učinak imaju željezov(II) fumarat, željezov(II) sulfat, željezov(II) glukonat i druge soli. Svaka od tih soli sadrži određenu količinu željeza od toga se 25% apsorbira. Najbolju bioraspoloživost i apsorpciju ima željezov(II) sulfat, dok se trovalentni oblik teže otapa te se s toga mora reducirati u dvovalentni. Također je poznato da vitamin C poboljšava topljivost željeza.<sup>3</sup>

### 1.1.3. Tardyferon

Tardyferon je farmaceutski lijek protiv anemije. Koriste ga osobe koje su izgubile velike količine krvi, sa slabom apsorpcijom željeza iz probavnog trakta. Također ga mogu konzumirati i trudnice. Svaka tableta sadrži 80 mg željeza u obliku željezova(II) sulfata uz dodatak askorbinske kiseline koja pospješuje asimilaciju i bioraspoloživost u tankom crijevu. Ima produženo djelovanje, gdje se željezo postupno oslobađa te na taj način olakšava podnošljivost samog lijeka i dugotrajno apsorpiranje. S druge strane apsorpciju usporavaju crni čaj, mliječni proizvodi, žumanjak jajeta, pripravci sa fosfatima, karbonatima, solima aluminija, magnezija kalcija i drugi. Konzumira se tri

do šest mjeseci. Preporučena doza ne smije se prekoračiti, u protivnom dolazi do predoziranja koje ima štetne posljedice.<sup>5</sup>

## 1.2. Spektroskopija

Spektroskopija je znanost koja proučava interakciju elektromagnetskog zračenja i materije. Te interakcije uključuju raspršenje, emisiju i apsorpciju zračenja. Izvori zračenja mogu biti vanjski i njih sustav izmjenjuje te sam sustav može biti izvor zračenja.<sup>6</sup>

Danas je spektroskopija jedna od najprimjenjivijih tehnika kako u kvalitativnoj tako i u kvantitativnoj analitičkoj kemiji. Njome se mjeri količina zračenja u ovisnosti o valnoj duljini, energiji, količini gibanja ili frekvenciji. Stoga se na temelju apsorbiranog ili emitiranog zračenja koje je jedinstveno za svaki atom ili molekulu materije, dobiva informacija o toj tvari, njenoj građi i sastavu u obliku spektra.<sup>7</sup>

Do danas se, osim svjetla i drugih oblika elektromagnetskog zračenja od radio valova do  $\gamma$ -zraka, značenje spektroskopske metode proširilo na elektronsku i masenu spektroskopiju koje ne uključuju elektromagnetsko zračenje.<sup>8</sup>

Spektar predstavlja raspodjelu energije zračenja po valnim duljinama. Ovisno o vrsti spektra spektroskopija se dijeli na dvije osnovne podjele: emisijska i apsorpcijska. Elektromagnetski spektar obuhvaća valne duljine od nekoliko kilometara pa sve do  $10^{-12}$  metara.<sup>7</sup>

### 1.2.1. Elektromagnetsko zračenje

Elektromagnetsko zračenje predstavlja energiju koja se širi prostorom velikom brzinom pri čemu dolazi do širenja magnetskih i električnih valova. Odnosno javlja se titranje magnetskog i električnog polja okomito na smjer širenja, jer sva užarena tijela zrače elektromagnetske valove. Zagrijanoj tvari se povećava energija što uzrokuje titranje atoma čije jezgre nose naboje. Oko naboja je uvijek prisutno električno polje, a s obzirom da titrira javlja se i magnetno polje. Stoga je naboj koji oscilira zapravo izvor elektromagnetnog vala.<sup>9</sup>

Energija zračenja simbolizira struju sitnih čestica kvanta energija poznatih kao fotoni, a ima i svojstva valova. Time se uzima u obzir dvojna priroda zračenja.<sup>7</sup>

Fotoni su čestice elektromagnetskog zračenja koje nemaju masu i čija energija ovisi o frekvenciji zračenja:

$$E = h\nu$$

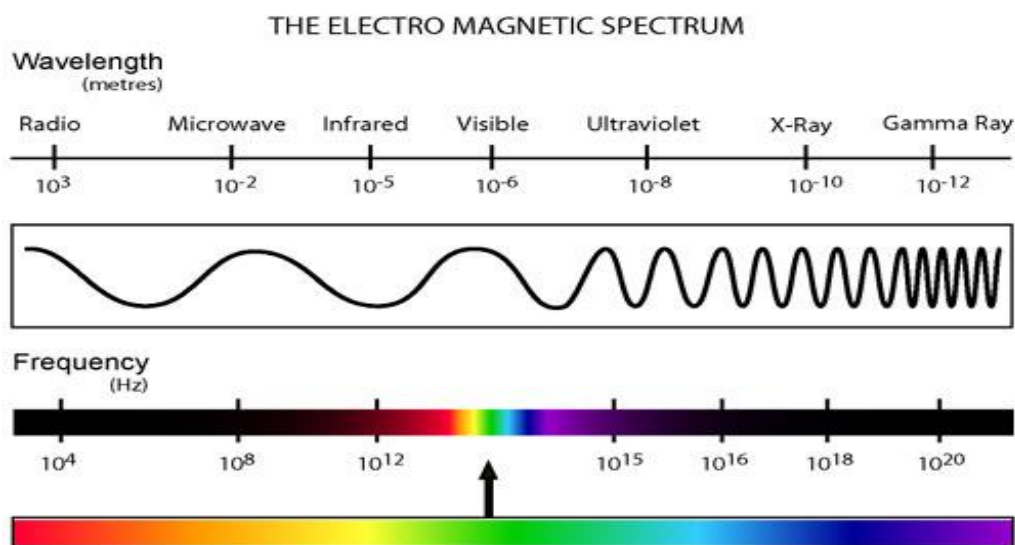
Član  $h$  je Planckova konstanta ( $6,63 \times 10^{-34}$  Js), a član  $\nu$  frekvencija zračenja koja simbolizira broj titraja u jednoj sekundi. Određena je izvorom zračenja te ne ovisi o mediju kroz koji se val širi.

Vežu između brzine svjetlosti i frekvencije opisujemo jednačinom:  $c = \lambda \nu$ . Brzina širenja vala ovisi o sredstvu. U vakuumu brzina širenja elektromagnetskog vala je najbrža i jednaka je brzini svjetlosti ( $c = 3 \cdot 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ). Dok u optički gušćem sredstvu dolazi do interakcije elektromagnetskog zračenja i atoma ili molekula sredstva te je brzina zračenja kao i valna duljina manja. Valna duljina opisuje udaljenost između dva valna maksimuma ili minimuma.

Ako energiju opišemo valnim brojem i valnom duljinom dobit ćemo izraz:

$$E = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

gdje je valni broj (recipročan valnoj duljini) kao i frekvencija proporcionalna energiji.<sup>8</sup>



Slika 1. Elektromagnetski spektar<sup>10</sup>

Elektromagnetski spektar pokriva veliki raspon energije i valnih duljina. Najveću energiju i najkraću valnu duljinu posjeduje gama zračenje, dok radiovalovi imaju najmanju energiju i valne duljine do nekoliko kilometara.

Dio spektra koji obuhvaća UV, Vis i IR zračenje često nazivamo optičkim tj. svjetlom iako se taj pojam odnosi samo na vidljivi dio spektra. Ultraljubičasto zračenje ili kraće UV obuhvaća valne duljine od 200 nm do 400 nm, a infracrveno od 800 nm pa preko  $10^5$  nm. Vidljivi dio spektra obuhvaća valne duljine od 400 nm do 800 nm, te je pomoću staklene prizme ili optičke rešetke moguće rastaviti na svjetla svih valnih duljina u tom rasponu. Na taj način postizemo vidljivi dio spektra sadržanog od ljubičaste boje, plave, zelene, žute, narančaste i crvene.<sup>9</sup>

Interakcija zračenja i atoma ili molekule materije dovodi do prijelaza atoma i molekula koji služe za identifikaciju njihove strukture. Navedeni prijelazi uzrokuju emisiju ili apsorpciju zračenja.<sup>8</sup>

### 1.2.2. Podjela spektroskopije

Osnovna podjela spektroskopije je na emisijsku i apsorpcijsku.

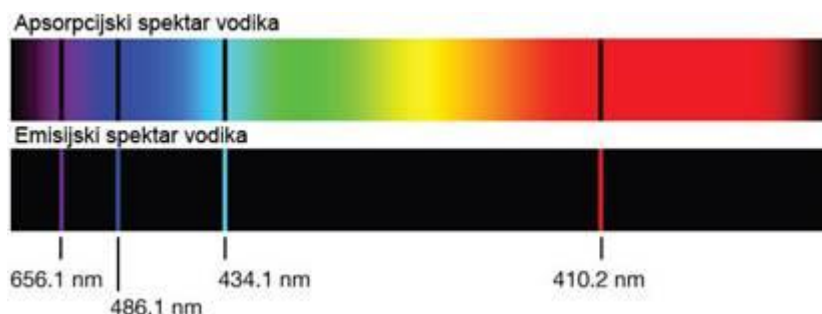
#### 1. Emisijska spektroskopija

Dovođenjem određene količine energije pobuđujemo ion, atom ili molekulu. Izvori energije, točnije pobude su različiti: plamen, električni luk, električna iskra, izvor elektromagnetskog zračenja, bombardiranje elektronima i slično. Pri tome atom prelazi iz osnovnog stacionarnog stanja u pobuđeno u kojem bude relativno kratko ( $10^{-6}$  –  $10^{-9}$  s). Prilikom vraćanja na niže ili osnovno stanje atom otpušta višak energije odnosno zrači je kao svjetlost. Energija zračenja se transmitira, spektrometar opaža samo onaj dio transmitiranog svjetla koji dolazi na pukotinu duž optičke osi. Zračenje se prikazuje emisijskim spektrima koji se dijele na kontinuirane, vrpčaste i linijske. Kontinuirane emisijske spektre daju užarena čvrsta tijela, dok linijske stvaraju plinovi.<sup>8</sup>

#### 2. Apsorpcijska spektroskopija

Apsorpcija je proces pri kojem se nekoj kemijskoj tvari u propusnoj okolini smanjuje frekvencija elektromagnetskog zračenja. U analitičkoj kemiji apsorpcijske karakteristike tvari se prikazuju apsorpcijskim spektrom. Funkcije slabljenja osnovnog snopa zračenja u ovisnosti promjene valne duljine, valnog broja ili frekvencije se prikazuju grafički.<sup>8</sup>

Tijekom apsorpcije elektromagnetskog zračenja ion, atom ili molekula dobivaju kvant energije zračenja, točnije foton, i pri tome prelazi iz stanja niže energije u stanje više energije takozvano pobuđeno stanje. Emisijom zračenja relaksira iz višeg stanja u niže ili osnovno stanje energije pri čemu otpušta kvant energije.<sup>6</sup>



**Slika 2.** Apsorpcijski i emisijski spektri vodika<sup>11</sup>

### 1.2.3. UV/VIS spektroskopija

Propuštanjem svjetla kroz otopinu koju ispitujemo dolazi do interakcije molekula otopine i zračenja što dovodi do loma svjetlosti i apsorpcije zračenja.<sup>12</sup>

Poznato je da apsorpcijom zračenja dolazi do energijskih promjena u strukturi ispitivane materije, stoga apsorpcija u vidljivom i ultraljubičastom zračenju uzrokuje elektronske prijelaze u atomima ispitivane otopine. Zahvaljujući tim promjenama može se kvalitativno i kvantitativno ispitati struktura analizirane otopine. Praćenje apsorpcije u ovisnosti o valnoj duljini zračenja koje prolazi kroz ispitivanu otopinu je cilj apsorpcijske spektrofotometrije. Apсорpcijska spektroskopija vidljivog i ultraljubičastog zračenja najkorištenija je spektrofotometrijska tehnika zbog svoje točnosti, praktičnosti, jednostavnosti i brzini izvedbe. Pomoću Beerovog zakona se određuje koncentracija obojenih otopina. Zakon opisuje odnos između koncentracije uzorka i intenziteta transmitiranog zračenja koji prolazi kroz polupropusni uzorak.<sup>13</sup>

U UV/VIS području elektromagnetskog zračenja apsorpcija se provodi s tekućim ili plinovitim uzorcima. Najčešće se koriste razrijeđene otopine s polupropusnim otapalom.<sup>14</sup>

Analiziranom uzorku skok elektrona iz popunjene orbitale niže energije u nepopunjenu orbitalu više energije omogućava energija koju uzorak apsorbira iz vidljivog i ultraljubičastog zračenja. S obzirom da je raspon valnih duljina u ultraljubičastom zračenju od 200 do 400 nm, a u vidljivom od 400 do 800 nm ispitivani spoj će apsorbirati ili propuštati svjetlost u tom rasponu. Svaki spoj ima specifičan apсорpcijski spektar u obliku širokih pikova koji se javljaju zbog struktura u molekuli spoja. Kromofor je dio molekule odgovoran za apсорpciju.<sup>13</sup>

Da bi atom ili molekula apsorbirala energiju zračenja ili svjetla, energija fotona mora odgovarati razlici energija između osnovnog i pobuđenog stanja, višeg energijskog stanja, čestice. Stoga razlikujemo atomsku i molekulsku apсорpciju.<sup>8</sup>

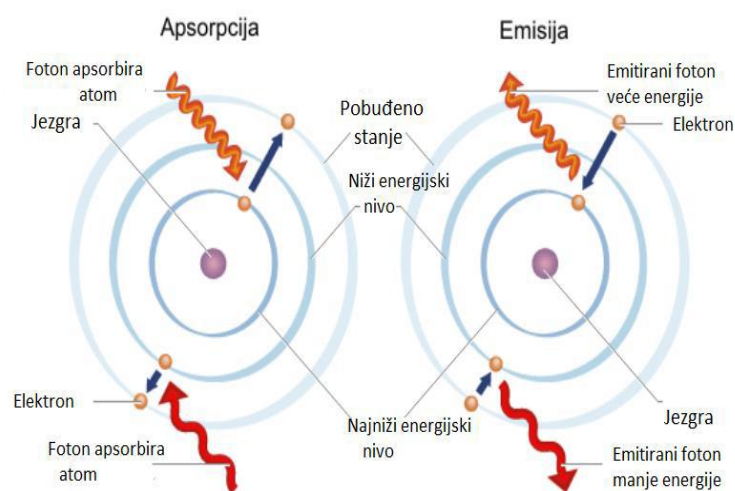


#### 1.2.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija

AAS je metoda kojom se dobivaju informacije o atomima na osnovi mjerenja apsorpcije vidljivog i ultraljubičastog zračenja koju apsorbiraju atomi neovisno o molekulama prisutnim u analiziranom uzorku. Primjenjuje se za određivanje koncentracija metalnih iona. Nepobuđeni atomi se plamenom ili ugrijanoj grafitnoj cijevi atomiziraju kako bi se pospješila apsorpcija energije zračenja. Zrake određene valne duljine se propuštaju kroz atomizirani uzorak, odnosno oblak atoma koji apsorбира dio energije upadne zrake. Apsorbirana energija uzrokuje pobudu elektrona iz vanjskih orbitala na više energijske nivoe, te se mjeri razlika upadne i izlazne zrake prije i poslije prolaska kroz uzorak, rezultat je spektar karakterističan za svaki element.<sup>14</sup>

Energijske razine elektrona u atomu uvjetuju širinu apsorpcijskih linija. Najčešće je izvor zračenja šuplja katoda, koji daje linijske spektre specifične za određeni element. AAS se koristi za kvantitativno određivanje metala u različitim materijalima.<sup>15</sup>

Pri snimanju AAS obično se spektrofotometri moraju prethodno izmijeniti. Razlog je što je širina atomskih apsorpcijskih linija znatno manja, čak za nekoliko redova veličine, od širine molekulskih apsorpcijskih linija. Stoga kada se koristi snop polikromatskog UV/VIS zračenja upotrebljavaju se spektrometri visoke razlučivosti u cilju dobivanja spektra vrlo uskih atomskih apsorpcijskih linija. Radi jednostavnosti atomska apsorpcija se mjeri pri jednoj valnoj duljini, monokromatskog izvora zračenja.<sup>9</sup>



Slika 3. Atomska apsorpcija i emisija<sup>16</sup>

### 1.2.5. Molekulska apsorpcijska spektroskopija

Molekulska spektroskopija istražuje energijske promjene unutar molekula tijekom interakcije sa elektromagnetskim zračenjem uslijed apsorpcije ili emisije zračenja, rezultat je spektar svojstven svakoj molekuli. Svaka molekula posjeduje specifičan sustav energijskih razina ovisno o njenoj strukturi. Dobiveni je spektar jedinstven te izvor informacija o strukturi i energijskim razinama molekule.<sup>14</sup>

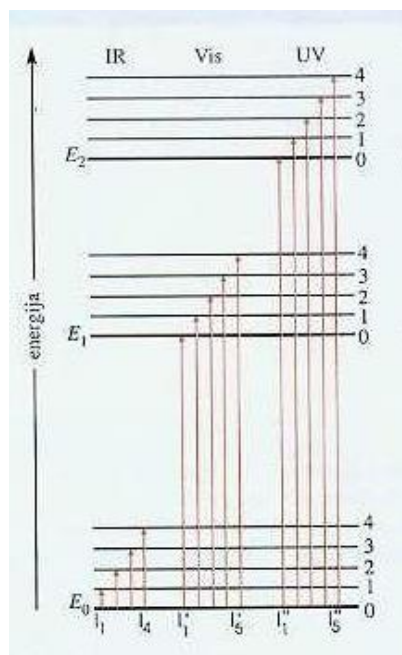
Kod pobuđivanja molekula vidljivim ili ultraljubičastim zračenjem dolazi do elektronskog, vibracijskog i rotacijskog prijelaza. Kod elektronskog prijelaza elektron iz atomske odnosno molekulske orbitale niže energije prelazi u orbitalu više energije pri čemu je dovedena energija fotona jednaka razlici tih dviju orbitala. Vibracijski prijelazi, ovisno o vezama unutar molekule, predstavljaju periodično kretanje ravnotežnog položaja jezgre. Vibracije molekula su kvantizirane. One vibriraju u određenim vibracijskim energijskim razinama, ukoliko je energija fotona jednaka razlici dviju vibracijskih energijskih razina dolazi do spektroskopskog prijelaza. Međutim, ukoliko dođe do promjene dipolnog momenta zbog vibracija molekula elektromagnetsko zračenje će se apsorbirati. Rotacijski prijelazi su posljedica velikog broja kvantiziranih rotacijskih stanja molekule oko njenog gravitacijskog centra.<sup>8</sup> Atomi i molekule sadrže uz elektronsko kretanje i translaciju, ako se uzme u obzir ostala dva kretanja molekule onda je ukupna energija molekule:

$$E = E_{elektronska} + E_{vibracijska} + E_{rotacijska} + E_{translacijska}$$

Pri čemu  $E_{translacije}$  predstavlja translacijsku energiju molekule,  $E_{rotacijska}$  energija jednaka rotacijama molekule oko gravitacijskog središta,  $E_{vibracijska}$  odnosi se na gibanja jezgri koje uzrokuju promjene u duljini kemijske veze i  $E_{elektronska}$  energija elektrona u različitim vanjskim molekulskim orbitalama. Gibanja jezgri i elektrona se promatraju zasebno i opisuju se neovisnim valnim funkcijama. Vibracijska energija znatno je manja od elektronske zbog sporog gibanja jezgri dok se elektroni oko nje gibaju. Odnosno prijelaz elektrona je toliko brz da ne može doći do promjene položaja jezgre koja je znatno teža od elektrona. Razlike u rotacijskim energijama su manje od onih u vibracijskim, koje su manje od elektronskih energetske razlike. Rotacijska i vibracijska struktura su sadržane u pikovima koji predstavljaju apsorpcijske linije na spektru. Također treba voditi računa o vrsti otapala. Otapalo u kojem je otopljen uzorak ne smije

apsorbirati UV/VIS zračenje u istom području kao i uzorak kako bi se izbjegli krivi rezultati na spektru.<sup>13</sup>

Spektroskopija bazirana na UV/VIS se nerijetko primjenjuje u kemijskim laboratorijima za kvantitativnu analizu organskih i anorganskih spojeva. Međutim, koristi se i za određivanje metala prisutnim u otopinama u anionskom obliku ili kompleksnom spoju metalnog iona i organskog ili anorganskog liganda.<sup>14</sup>



**Slika 4.** Dijagram energijskih razina koji prikazuje energijske promjene molekule pri apsorpciji<sup>17</sup>

### 1.2.6. Beerov zakon

Djelovanjem energije u obliku zračenja ili svjetla na određenoj valnoj duljini na analit u osnovnom stanju, on apsorbira zračenje i prelazi u pobuđeno stanje više energije. Kao što je već spomenuto određena molekula će apsorbirati zračenje pri onim valnim duljinama koje sadrže energiju jednaku razlici energije koju ima molekula pri prijelazu iz osnovnog u pobuđeno stanje. Mjerenjem emitiranog zračenja pri vraćanju u osnovno stanje ili mjerenjem apsorbiranog elektromagnetskog zračenja kao rezultat pobude molekule dobivaju se informacije o analitu. Valna duljina pri kojoj ispitivana tvar najbolje apsorbira zračenje se može očitati iz snimljenog spektra, a iz izmjerene apsorbancije se može odrediti koncentracija tvari iz ispitivane otopine.

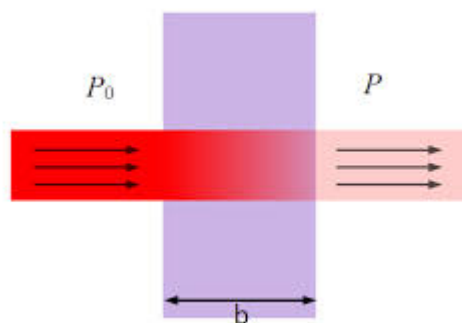
Propuštanjem snopa zraka na uzorak ovisno o strukturi molekula i frekvenciji zračenja, zrake mogu biti apsorbirane, transmitirane ili raspršene. Energija apsorbiranog svjetla zadržana je u volumenu uzorka, izlazno transmitirano svjetlo ima isti smjer kao i upadno, dok se raspršeno svjetlo širi u smjeru drugačijem od smjera upadnog.

Transmitancija ili propusnost,  $T$ , opisuje količinu neapsorbiranog zračenja, odnosno dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu. Izračunava se prema izrazu:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

gdje je  $P_0$  snaga snopa na početku koja se smanjila na  $P$  nakon što molekule apsorbiraju zračenje. Izražava se u postocima. Što je veći broj molekula i njihova učinkovitost apsorbiranja to je veća i sama apsorpcija. Iz toga proizlazi Beerov zakon da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste.<sup>18</sup>

Apsorbancija  $A$  otopine se prigušenjem osnovnog snopa povećava. Opisuje količinu apsorbiranog zračenja.



**Slika 5.** Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini<sup>19</sup>

$$A = \log \frac{P_0}{P}$$

Pri čemu je  $P_0$  snaga upadnog zračenja, a  $P$  snaga zračenja koje prolazi kroz otopinu. Eksperimentalno se ne mjeri  $P_0$  već  $P_{otapala}$  kao snaga upadnog zračenja koje prolazi kroz kivetu s otopinom, onda se eksperimentalna apsorpcija opisuje izrazom:

$$A = \log \frac{P_{otapala}}{P_{otopina}} = \log \frac{P_0}{P}$$

Beerov zakon onda predstavlja funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom, apsorpcija, i veličine koja se određuje, koncentracije:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc$$

gdje  $a$  predstavlja konstantu proporcionalnosti, apsorptivnost, a  $b$  duljinu puta zračenja (debljina kivete) i  $c$  koncentraciju otopine izraženu u  $\text{mol L}^{-1}$ . Uzimajući u obzir da se  $b$  izražava u cm onda je konstanta proporcionalnosti izražena u  $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  jer je apsorpcija bezdimenzijska veličina. Tada je izraz za Beerov zakon:

$$A = \epsilon bc$$

Molarna apsorptivnost,  $\epsilon$ , govori kolika je vjerojatnost apsorpcije pri određenoj valnoj duljini za određenu koncentraciju ispitivane otopine. Ovisnost  $\epsilon$  o valnoj duljini prikazuje se grafički apsorpcijskim spektrom.

Na izgled spektra utječe otapalo, interakcije između otapala i molekula i konjugacije u molekuli. Što otopina ima intenzivniju boju tj. veću koncentraciju to će apsorpcija analita biti veća jer velik broj molekula dolazi u interakciju sa svjetlom te je pik na spektru veći. Međutim u razrijeđenim otopinama boja je slabija do skoro prozirna, tada je i apsorpcija niska.<sup>13</sup>

Beerov zakon vrijedi i za smjese. Kada se otopina sastoji od više komponenti koje apsorbiraju ukupna apsorpcija smjese je<sup>8</sup>:

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = \varepsilon_1 b_1 c_1 + \varepsilon_2 b_2 c_2 + \varepsilon_3 b_3 c_3 + \dots + \varepsilon_n b_n c_n$$

### Ograničenja Beerova zakona

Beerov zakon vrijedi samo za razrijeđene otopine gdje je koncentracija manja od 0,01 M i za monokromatska svjetla. U otopinama visokih koncentracija čestice koje apsorbiraju su bliže jedna drugoj i tako svaka čestica utječe na raspodjelu naboja susjedne čestice. Pri tome se mijenjaju svojstva apsorpcije pri određenoj valnoj duljini što uzrokuje odstupanje od linearnog odnosa apsorpcije o koncentraciji. Promjena koncentracije uzrokuje promjene molarne apsorptivnosti. Također prisutnost visoke koncentracije elektrolita u razrijeđenim otopinama uzrokuje promjenu molarne apsorptivnosti. Odstupanja od zakona se javljaju i zbog promjene indeksa loma otopine jer apsorptivnost ovisi o indeksu loma otopine.

Kemijska odstupanja se javljaju zbog asocijacije, disocijacije ili reagiranja vrste koja apsorpira sa otapalom.

Instrumentalna odstupanja posljedica su primjene polikromatskog zračenja i zalutalog zračenja.<sup>8</sup>

### 1.3. UV/VIS molekulska apsorpcijska spektroskopija

Apsorpcijskom spektroskopijom se određuju vrste molekula koje apsorbiraju vidljivo ili ultraljubičasto zračenje. Apsorpcija UV/VIS zračenja se prikazuje elektronskim apsorpcijskim vrpčama. Svaka vrpca sadrži ogroman broj vrlo bliskih rotacijskih i vibracijskih linija koje su posljedica prijelaza elektrona iz osnovnog stanja u rotacijska i vibracijska energijska stanja koja su povezana s pobuđenim energijskim stanjem elektrona.<sup>8</sup>

#### Apsorpcija organskih spojeva

U organskim molekulama elektroni koji sudjeluju u kemijskim vezama takozvani podijeljeni elektroni i vanjski nepodijeljeni elektroni koji se nalaze oko atoma (kisik, dušik, sumpor i halogeni elementi) su zaslužni za apsorpciju zračenja. Ovisno o jačini kojom su vezani elektroni organske molekule ovisne valne duljine pri kojim ona apsorbira. Primjerice spektri s jednostrukim vezama uzrokuju probleme pri mjerenju jer su elektroni u tim vezama toliko čvrsto vezani zbog čega je potrebno mnogo energije za njihovo pobuđivanje. Spojevi s nezasićenim dvostrukim i trostrukim vezama imaju elektrone koji su slabije vezani pa se lako pobuđuju. Spektri takvih spojeva imaju korisne apsorpcijske maksimume u dostupnom UV zračenju. Kromoforima se nazivaju organske funkcionalne, nezasićene, skupine koje apsorbiraju u UV/VIS području. Međutim organski spojevi sa jodom, bromom i sumporom također apsorbiraju u tom području jer navedeni elementi posjeduju slabo vezane nepodijeljene elektrone koji se mogu lakše pobuditi od podijeljenih u zasićenim vezama.<sup>8</sup>

#### Apsorpcija anorganskih spojeva

Apsorpcijski spektri anorganskih molekula i kompleksnih iona slični su spektrima organskih molekula, jedina značajnija iznimka su aktinidi i lantanidi. Njihovi elementi imaju elektrone koji apsorbiraju i koji su zasjenjeni vanjskim utjecajima elektrona u orbitalama većeg glavnog kvantnog broja. Stoga se javljaju uže apsorpcijske vrpce na koje priroda vrsta vezanih pomoću vanjskih elektrona nema utjecaja.

Spojevi elemenata 18. skupine prvih dvaju prijelaznih nivoa su u svim, više-manje, oksidacijskim stupnjevima obojani. Apsorpcija u vidljivom području zračenja uzrokuje elektronske prijelaze između popunjene i nepopunjene d-orbitale. Te dvije d-orbitale energijski se razlikuju zbog vezanja liganda na ion metala. O mjestu elementa u PSE, njegovom stupnju oksidacije i vrsti liganda koji je vezan na metalni ion ovise opisane energijske razlike i mjesto apsorpcijskog maksimuma.<sup>8</sup>

### Apsorpcija prijenosa naboja

Apsorpcija prijenosa naboja od velike je koristi za kvantitativne analize zbog ogromne vrijednosti molarne apsorptivnosti ( $\epsilon_{max} > 10\ 000$ ) koja uzrokuje visoku osjetljivost određivanja. Kompleksi s prijenosom naboja se nazivaju organski i anorganski kompleksni spojevi koji podliježu apsorpciji prijenosa naboja. Oni imaju grupu donor elektrona vezanu na akceptor elektrona, njihov produkt apsorbira zračenje pri čemu elektron iz donorske grupe prelazi u orbitalu vezanu za akceptorsku skupinu. Unutarnji redoks proces uzrokuje pobuđeno stanje. Zbog toga su drugačiji od organskih kromofora u kojim su pobuđeni elektroni u molekulskoj orbitali podijeljeni između dva ili više atoma. Kompleksi prijenosa naboja koji sadrže metalni ion, metal ima ulogu akceptora elektrona.

Spektri ove vrste se dobivaju apsorpcijom fotona pri čemu kompleksima prijelaznih metala elektron putuje s metala na ligand ili obrnuto.<sup>8</sup>



#### 1.4. Instrumenti u optičkoj spektroskopiji

Svaki spektroskopski uređaj se sastoji od pet osnovnih dijelova:

- 1- stabilnog izvora zračenja,
- 2- selektora valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja,
- 3- jednog ili više spremnika za uzorak,
- 4- detektora zračenja ili pretvornika energije zračenja u mjerljivi signal,
- 5- procesora signala i uređaj za njegovo očitavanje.

Izvori zračenja apsorpcijske i fluorescencijske spektroskopije su vanjski izvori koji su konstantan izvor snažnog zračenja. Ovisno o vrsti zračenja postoje različiti izvori zračenja. Kod spektroskopije u ultraljubičastom zračenju izvor je vodikova ili deuterijeva žarulja koje električnim pobuđivanjem deuterija ili vodika pri niskom tlaku daju upotrebljiv kontinuirani spektar. Žarulja sa volframovom niti je izvor vidljivog zračenja i u bliskom infracrvenom području. Često se koriste i žarulje volfram/halogen zbog duljeg vijeka trajanja, većeg intenziteta i valnog područja. Dok se s druge strane kontinuirano infracrveno zračenje dobiva koristeći užarene inertne krutine.

Uloga selektora valnih duljina je da sužava mjerno zračenje do uskih vrpca koje uzorak emitira ili apsorbira. Uske vrpce omogućavaju veću podudarnost s Beerovim zakonom. Selektor ne može izdvojiti zračenje jedne valne duljine, već skupinu susjednih valnih duljina zvanih vrpcom. Razlikujemo dvije vrste selektora valnih duljina: filtri i monokromatori. Monokromatori se sastoje od pukotina, leća, zrcala, disperznog sredstva (refleksijska rešetka i prizma).<sup>8</sup>

Pomoću prizme ili optičke rešetke se izvor svjetlosti razdvaja prema valnim duljinama. O širini izlazne pukotine ovisi raspon valnih duljina, a o širini pukotine između izvora i prizme ovisi moć razlučivanja. Rad filtra se temelji na apsorpciji svih valnih duljina kontinuiranog izvora osim jedne ograničene vrpce.<sup>13</sup>

Uređaj koji ukazuje na postojanje neke fizičke veličine naziva se detektor. Posebna su vrsta detektora koji pretvaraju signale kao što su pH, temperatura, masa u električni signal. Električni signal se pretvara u broj koji označava veličinu početnog signala. Električni signal iz detektora pojačava procesor signala. U uređaje za očitavanje se

ubraja uređaj za digitalno očitavanje, pisala, potenciometrijske ljestvice, monitori mikroracunala i cijevi s katodnim zrakama.

Spremnici za uzorke su kivete ili ćelije. One moraju biti načinjene od prozirnog materijala. Za rad u ultraljubičastom području se koristi kvarc ili silikatno staklo, a u vidljivom dijelu spektra se mogu koristiti i plastične kivete. Za područje infracrvenog dijela spektra se koristi kristalični natrijev klorid.<sup>8</sup>

Širina kivete određuje duljinu put svjetlosti kroz uzorak. Najčešće to iznosi 1 cm. Intenzitet zrake prije i nakon prolaska kroz uzorak mjeri se jednosnopnim ili dvosnopnim spektrofotometrom. U slučaju rada s otopinama kao referentni uzorak uzima se čisto otapalo. Kiveta referentnog uzorka mora biti iste debljine i materijala kao i kiveta za uzorke. To vrijedi za jednosnopne spektrofotometre. Kod dvosnopnih se zraka monokromatske svjetlosti dijeli na dva snopa. Jedan snop, istodobno ili naizmjenice, prolazi kroz ispitivani uzorak, a drugi kroz referentni uzorak te se njihovi intenziteti na kraju uspoređuju. Upadni kut zrake je  $90^\circ$  čime se izbjegava lom zrake. Kod izbora materijala kivete i otapala treba voditi računa jer i otapalo i stijenke kivete mogu apsorbirati zračenje u određenom dijelu spektra.<sup>13</sup>

#### 1.4.1. Vrste spektroskopskih instrumenata

Spektroskop je uređaj koji ima modificirani monokromator s pokretnom lećom koja osigurava vizualnu detekciju emisijskih linija. Mjerenjem kuta između upadnog snopa i puta linije do leće odredi se valna duljina linije. Koristi se za ustanoviti elemente u uzorku koji se u zagrijanoj okolini pobuđuje.

Kolorimetar je naprava u kojoj ljudsko oko djeluje kao detektor za apsorpcijska mjerenja. Međutim, pri svakom korištenju uređaja potrebni su standardi za uspoređivanje.

Fotometar je instrument koji služi za mjerenje apsorpcije, emisije i fluorescencije pomoću infracrvenog, vidljivog ili ultraljubičastog zračenja. Sastoji se od fotoelektrične naprave za mjerenje snage zračenja i apsorpcijskim ili interferencijskim filterima za selektiranje valnih duljina. Fotometar koji se koristi za fluorescencijska mjerenja zove se fluorimetar, a onaj za apsorpcijska mjerenja s vidljivim zračenjem kolorimetrom.

Spektrograf se koristi za kvalitativnu analizu elementa. Na fotografsku ploču ili film, postavljen uz žarišnu ravninu monokromatora, snima spektre. Spektri se uočavaju kao niz crnih slika ulazne pukotine.

Spektrometar ima u žarišnoj ravnini pričvršćen monokromator s pukotinom. Spektrometar s fotopretvornikom naziva se spektrofotometar i koristi se za apsorpcijska, emisijska i fluorescencijska mjerenja.

Spektrofotometar za vidljivo i ultraljubičasto zračenje se sastoji od deuterijske lampe za UV područje, volframove lampe za vidljivo područje, refleksijske optičke rešetke kao monokromatora, nosača uzorka i fotomultiplikatora kao detektor zračenja.<sup>8</sup>

### **1.5. Primjena UV/VIS spektroskopije**

UV/VIS spektroskopija se primjenjuje za određivanje koncentracija i dokazivanje pojedinih tvari u otopini. Također za dobivanje informacija o strukturi i građi spojeva, najčešće organskih.

#### Kvalitativna primjena

Važna je za otkrivanje kromofornih skupina, identifikaciju i otkrivanje strukture analita. No, ultraljubičasti spektri zbog jednostavnosti nemaju suviše fine strukture za dokazivanje analita. Stoga je potrebno dobivene podatke nadopuniti uz pomoć IR-a, NMR-a i spektrometrije masa. Ali, ipak se mogu dobiti informacije o prisutnosti kromofora u molekuli. Npr. pojava jednog ili više maksimuma između 200 i 400 nm govori o prisutnosti nezasićenih skupina.

Za kvalitativnu analizu se koriste razrijeđene otopine i prozirno otapalo koje osigurava dovoljnu količinu otopljenog uzorka za dobivanje što boljeg maksimuma. Izuzetno je važno paziti na interakciju s tvarima koje apsorbiraju, jer polarnost otapala djeluje na položaj apsorpcijskog maksimuma. Također širina pukotine kao i raspršeno zračenje utječu na kvalitativnu primjenu spektra.<sup>8</sup>

### Kvantitativna primjena

UV/VIS apsorpcijska spektroskopija najprimjenjivija je tehnika u kvantitativnoj analitičkoj kemiji zbog svoje točnosti, preciznosti, osjetljivosti i jednostavnosti. Koristi se za izravno određivanje organskih, anorganskih i biokemijskih vrsta, koje se mogu točno identificirati i pri niskim koncentracijama ( $10^{-4}$  –  $10^{-5}$  M, čak i niže). Osim velike osjetljivosti važna značajka je i velika selektivnost, te se može pronaći valna duljina pri kojoj samo uzorak apsorbira. Druga važna značajka kvantitativne primjene je određivanje onih analita koje ne apsorbiraju u UV/VIS području. To se postiže reakcijom s kromofornim reagensom koja daje produkt koji apsorbira u UV/VIS dijelu spektra. Također se može izravnim fotometrijskim ili spektrofotometrijskim postupkom kvantitativno odrediti organski spojevi sa jednom ili više kromofornih skupina i anorganske vrste koje apsorbiraju vidljivo ili ultraljubičasto zračenje.<sup>8</sup>

### Pojedinosti mjernog postupka

Pri spektrofotometrijskom ili fotometrijskom postupku cilj je postići ako je moguće linearan odnos između apsorpcije i koncentracije. Treba voditi računa o odabiru valne duljine. Stoga se mjerenja apsorpcije vrše pri valnoj duljini koja odgovara nekom apsorpcijskom maksimumu, jer je u toj točki promjena apsorpcije po jedinici koncentracije najveća. Tada se postiže najveća osjetljivost i dobra linearnost. Kod mjerenja fotometrom uzima se filter boje koja je komplementarna boji otopine uzorka. S druge strane treba uzeti i obzir parametre koji utječu na apsorpciju. Na apsorpciju otopine utječu razni faktori: priroda otapala, koncentracija elektrolita, temperatura, pH, vrijeme trajanja reakcije i prisutnost tvari koje interferiraju. Potrebno je redovito čistiti kivete kako bi se postigla visoka točnost određivanja koriste se sparene kivete visoke kakvoće. Treba ih redovno međusobno baždari kako bi se otklonile razlike koje mogu biti posljedica raznih oštećenja. Za određivanje odnosa između apsorpcije i koncentracije koriste se standardne baždarne otopine. One po svom sastavu moraju biti što sličnije uzorcima i pokrivati što veće područje koncentracija uzoraka kako bi se odredila molarna apsorptivnost.<sup>8</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Aparatura i kemikalije

Kemikalije i otopine korištene prilikom eksperimentalnog rada:

- željezov(III) nitrat nonahidrat ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ),
- sulfosalicilna kiselina ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$ ),
- koncentrirana dušična kiselina ( $\text{HNO}_3$ ),
- vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),
- Tardyferon tablete (aktivna tvar  $\text{FeSO}_4$ ).

Aparatura i pribor korišten prilikom eksperimenta:

- staklene tikvice i čaše,
- mikropipete,
- mikrovalna peć,
- UV/VIS spektrofotometar.



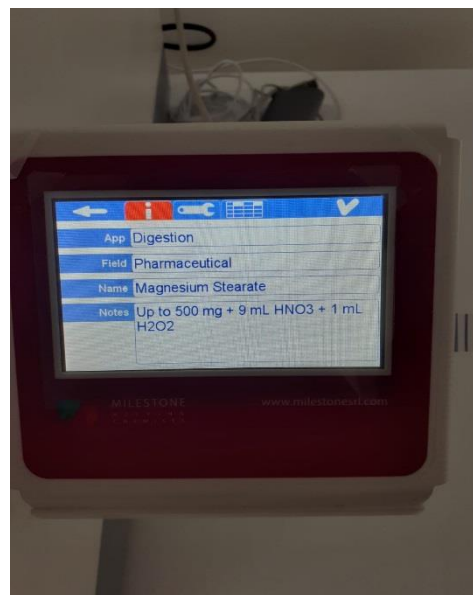
**Slika 6.** Uzorak tablete Tardyferon

### 2.2. Mikrovalna digestija

Digestija ili raspadanje je proces gdje se razara matica uzorka kako bi analit bio slobodan i topljiv te se nalazio u obliku pogodnom za određivanje odabranom analitičkom metodom. Većina postupaka raščinjavanja uzorka za analizu temelji se na

otapanju jakim kiselinama pri visokim temperaturama. Da bi se željezo iz tablete Tardyferon analiziralo molekulskom apsorpcijom tabletu treba prevesti iz čvrste faze u otopinu jer se spektrometar temelji na analizi otopina.<sup>20</sup>

U ovom eksperimentu se provodila mokra digestija pomoću mikrovalnog zračenja uz oksidirajuća sredstva za utvrđivanje sadržaja  $\text{Fe}^{3+}$  i u zatvorenom sustavu radi lakšeg kontroliranja tlaka i temperature. U posebne kivete stavljena je 1 tableta Tardyferona, 9 ml koncentrirane dušične kiseline i 1ml vodikovog peroksida. Na mikrovalnoj peći postavljen je odgovarajući program predviđen za raščinjavanje tablete, pri temperaturi  $200^\circ\text{C}$  u vremenu od 15 minuta. Aktivna tvar u tabletama Tardyferon je željezov(II) sulfat i njegovim bombardiranjem mikrovalovima i visokim temperaturama se poboljšava topljivost željeza u otopini. Prisutan vodikov peroksid u otopini oksidira otopljeni  $\text{Fe}^{2+}$  ion u  $\text{Fe}^{3+}$  ion. Na kraju mikrovalne digestije uz dobivenu otopinu u tikvici su zaostali najvjerojatnije silikati, koje samo enzimi iz našeg probavnog sustava mogu razgraditi.



Slika 7. Mikrovalna peć za digestiju

Slika  
raščin

### 2.3. Priprema otopina za rad

Prvo je napravljena krivulja umjeravanja. Prethodno su pripremljene serije otopina odredivanog sastojka poznatih koncentracija ( $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ ) tj. standardne otopine za izradu krivulje umjeravanja. Potom se izmjere njihove pripadajuće apsorbancije ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ) u odnosu za slijepu probu. Konstruira se krivulja umjeravanja tako da se odredi valna duljina pri kojoj je apsorbancija najveća ( $\lambda_{max}$ ). Nakon napravljene krivulje umjeravanja napravljeni su uzorci Tardyferona. Pripremljene su četiri otopine različitih koncentracija kompleksa za apsorpcijsko mjerenje. Za pripremu tih otopina koristila se otopina željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) dobivena mikrovalnom digestijom tj. realni uzorak i sulfosalicilna kiselina. Pri njihovoj reakciji nastaje kompleks ljubičastog obojenja. Stehiometrijski odnos željeza i sulfosalicilne kiseline u dobivenom kompleksu je 1:4.

Koncentracija kompleksa su:  $c_1 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

$$c_2 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

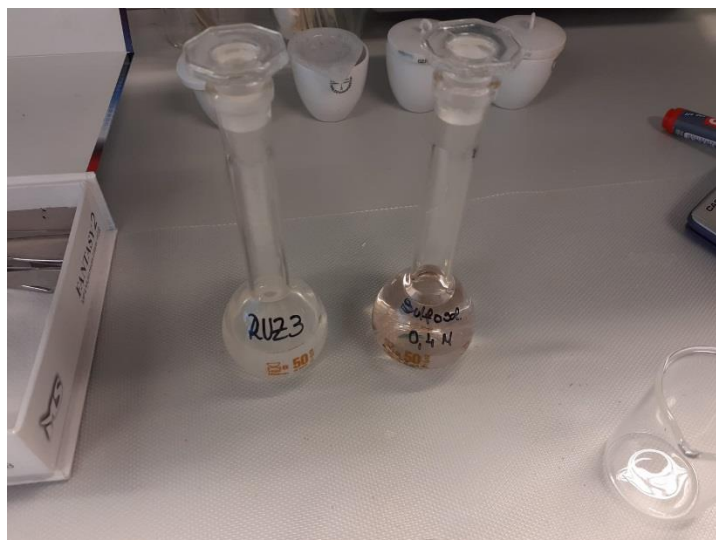
$$c_3 = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$c_4 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

za pripravu tih koncentracija koristile su se kemikalije:

$$c(\text{Fe}^{3+} / \text{realni uzorak 3}) = 0,02865 \text{ mol L}^{-1}$$

$$c(\text{sulfosalicilne kiseline}) = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$$



**Slika 9.** Otopine željeza (realni uzorak 3) i sulfosalicilne kiseline za pripremu kompleksa



•Priprema i proračun za prvu koncentraciju kompleksa,  $c_1$

$$c_1(\text{Fe}^{3+}/ \text{realni uzorak 3}) = 0,02865 \text{ mol L}^{-1}$$

$$c_1(\text{sulfosalicilna kiselina}) = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$$

$$c_2(\text{Fe}^{3+}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_2(\text{Fe}^{3+}) = 25 \text{ ml} = 0,025 \text{ L}$$

$$c_2(\text{sulfosalicilne kiseline}) = 4 \cdot (5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}) = 2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_2(\text{sulfosalicilne kiseline}) = 25 \text{ ml} = 0,025 \text{ ml}$$

$$c_1 V_1 = c_2 V_2 \rightarrow V_1 = \frac{c_2 V_2}{c_1}$$

$$V_1(\text{Fe}^{3+}/ \text{realni uzorak 3}) = \frac{5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L} \cdot 0,025 \text{ L}}{0,02865 \text{ mol/L}} = 4,36 \text{ ml}$$

$$V_1(\text{sulfosalicilna kiselina}) = \frac{2 \cdot 10^{-2} \text{ mol/L} \cdot 0,025 \text{ L}}{0,4 \text{ mol/L}} = 1,25 \text{ ml}$$

U tikvicu od 25 ml mikropipetom je stavljeno 4,36 ml realnog uzorka i 1,25 ml sulfosalicilne kiseline koncentracije  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  i pažljivo do oznake nadopunjeno s koncentriranom  $\text{HNO}_3$  pri  $\text{pH}=1$ . Nastao je ljubičasti kompleks čija je  $c(\text{Fe}^{3+}) = 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  i  $c(\text{sulfosalicilna kiselina}) = 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ .

Dobivena otopina dalje je razrijeđena kako bi se dobila koncentracija kompleksa  $c_2 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

- Proračun pripreme kompleksa koncentracije  $c_2$

$$c_1 = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

$$c_2 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_2 = 50 \text{ ml} = 0,05 \text{ L}$$

$$V_1 = \frac{5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \cdot 0,05 \text{ L}}{5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}} = 5 \text{ ml}$$

U tikvicu od 50 ml je mikropipetom dodano 5 ml kompleksa koncentracije  $c_1$  i do oznake napunjeno koncentriranom dušičnom kiselinom pri pH=1. Nastao je kompleks koncentracije  $c_2 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , ali je ljubičasta boja manje intenzivnija. Ova otopina dalje je razrijeđena kako bi se dobio kompleks koncentracije  $c_3$ .

- Proračun pripreme otopine kompleksa koncentracije  $c_3$

$$c_1 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$c_2 = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_2 = 25 \text{ ml} = 0,025 \text{ L}$$

$$V_1 = \frac{2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \cdot 0,025 \text{ L}}{5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}} = 12,5 \text{ ml}$$

U tikvicu od 25 ml mikropipetom je dodano 12,5 ml otopine kompleksa koncentracije  $c_2$  te dušičnom kiselinom oprezno nadopunjeno do oznake. Dobivena otopina sadrži koncentraciju kompleksa  $c_3 = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , boja nastalog kompleksa je još svjetlija od prethodno pripremljene otopine. Razrjeđenjem nastale otopine dobiva se četvrta otopina kompleksa koncentracije  $c_4$ .

- Proračun pripreme otopine kompleksa koncentracije  $c_4$

$$c_1 = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$c_2 = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$V_2 = 25 \text{ ml} = 0,025 \text{ L}$$

$$V_1 = \frac{1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \cdot 0,025 \text{ L}}{2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}} = 10 \text{ ml}$$

U tikvicu od 25 ml mikropipetom dodano je 10 ml prethodno napravljene otopine te potom do oznake nadopunjeno koncentriranom dušičnom kiselinom pri  $\text{pH} = 1$ . Nastali kompleks sadrži koncentraciju željeza  $c_4(\text{Fe}^{3+}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Intenzitet boje kompleksa proporcionalan je koncentraciji. Tako je boja ove otopine prozirno ljubičasta.

Sve četiri pripravljene otopine ostavljene su 30 minuta zbog kinetike kompleksa.

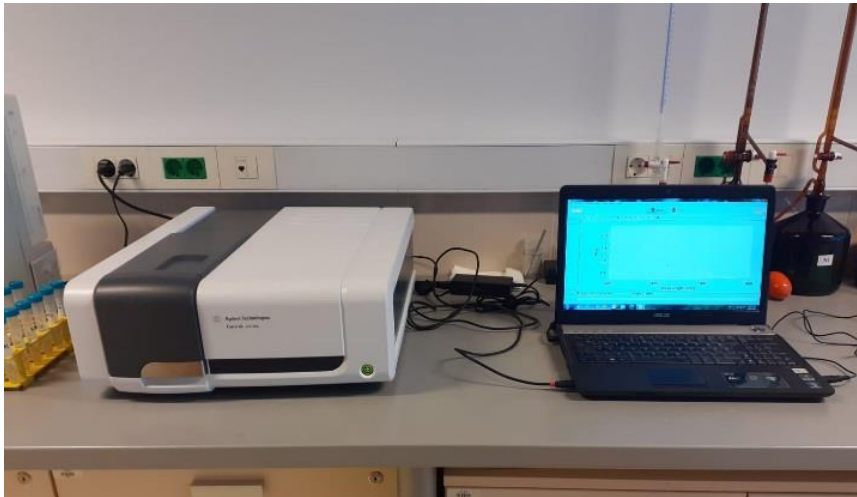


**Slika 10.** Prikaz boja pripremljenih otopina



## 2.4. UV/VIS mjerenje spektra

Korišten je The Agilent Cary 60 UV/VIS spektrofotometar. Sadrži dvostruki snop i Czerny-Turner monokromator. Služi za transmisijsko i apsorpcijsko mjerenje otopina i krutina u vidljivom i u UV dijelu spektra. Uređaj mjeri apsorpciju otopina u mjernom području od 190 do 1100 nm. Kao izvor svjetlosti koristi ksenonsku žarulju. Upravljan je putem računala s operativnim sustavom Microsoft Windows koji bilježi rezultate brojačno za određeni raspon valnih duljina i putem krivulja.



**Slika 11.** Spektrofotometar The Agilent Cary 60

### Postupak mjerenja

Prije samog mjerenja spektara uzorka vrši se slijepa proba gdje se koristi otapalo, jer se od svih spektara izmjerenih za otopine oduzima apsorpcijski spektar otapala. U ovom eksperimentu kao otapalo koristila se koncentrirana dušična kiselina.

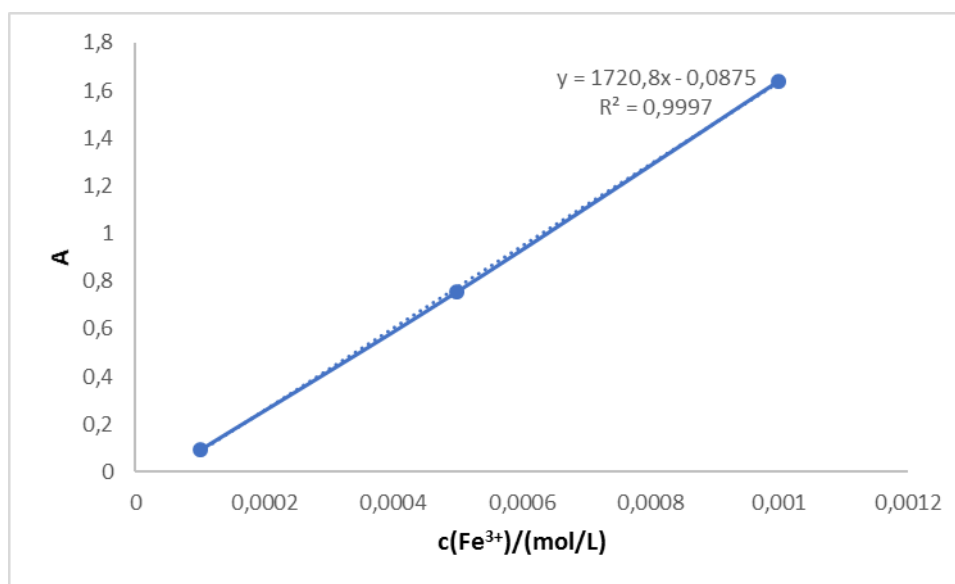
Kiveta od kvarcnog stakla se nadopuni do 3/4 pripremljenim otopinama ljubičastog kompleksa. Potom se stavi u držač namijenjen za to, zrake svjetlosti dolaze do uzorka, jedan dio svjetlosti se apsorbira, a drugi dio transmitira. Instrument mjeri apsorbanciju po Beerovom zakonu.

### 3. REZULTATI

U tablici 1. prikazane su koncentracija i izmjerena apsorbancija otopina. Na osnovu podataka iz tablice konstruirana je krivulja umjeravanja prikazana na slici 12.

**Tablica 1.** Koncentracija ( $c$ ) i izmjerena apsorbancija ( $A$ ) standardnih otopina za krivulju umjeravanja

oznaka	$c(\text{Fe}^{3+})/\text{molL}^{-1}$	$\lambda/\text{nm}$	$A$
R3	$1 \cdot 10^{-3}$	507,0	1,640
R4	$5 \cdot 10^{-4}$	507,0	0,757
R5	$1 \cdot 10^{-4}$	507,0	0,093



**Slika 12.** Graf krivulje umjeravanja

#### Rezultati mjerenja UV/VIS apsorpcije otopina ljubičastog željezovog kompleksa:

Spektroskopijska mjerenja apsorpcije izvode se pri valnoj duljini koja odgovara nekom apsorpcijskom maksimumu, jer je u toj točki promjena apsorpcije po jedinici koncentracije najveća. Stoga je na istoj valnoj duljini očitani apsorpcijski maksimum za svaku koncentraciju.

**Tablica 2.** Izmjerene apsorbancije ( $A$ ) za različite koncentracije  $\text{Fe}^{3+}$  kompleksa

oznaka	$c(\text{Fe}^{3+})/\text{molL}^{-1}$	$\lambda/\text{nm}$	$A$
T <sub>4</sub>	$1 \cdot 10^{-4}$	506,0	0,074
T <sub>3</sub>	$2,5 \cdot 10^{-4}$	506,0	0,228
T <sub>2</sub>	$5 \cdot 10^{-4}$	506,0	0,463
T <sub>1</sub>	$5 \cdot 10^{-3}$	506,0	1,746

Stvarne koncentracije željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iz pripremljenih uzoraka očitaju se iz krivulje ili odrede jednadžbom pravca opisanom Beerovim zakonom.

Korištenjem sljedećih izraza izračunate su koncentracije željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) u uzorcima farmaceutskog pripravka Tardyferon:

$$A \equiv y$$

$$c \equiv x$$

$$A \equiv 1720,8x - 0,0875$$

$$c = \frac{A+0,0875}{1720,8}$$

$$\text{za otopinu T}_1: c = \frac{1,746+0,0875}{1720,8} = 1,07 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

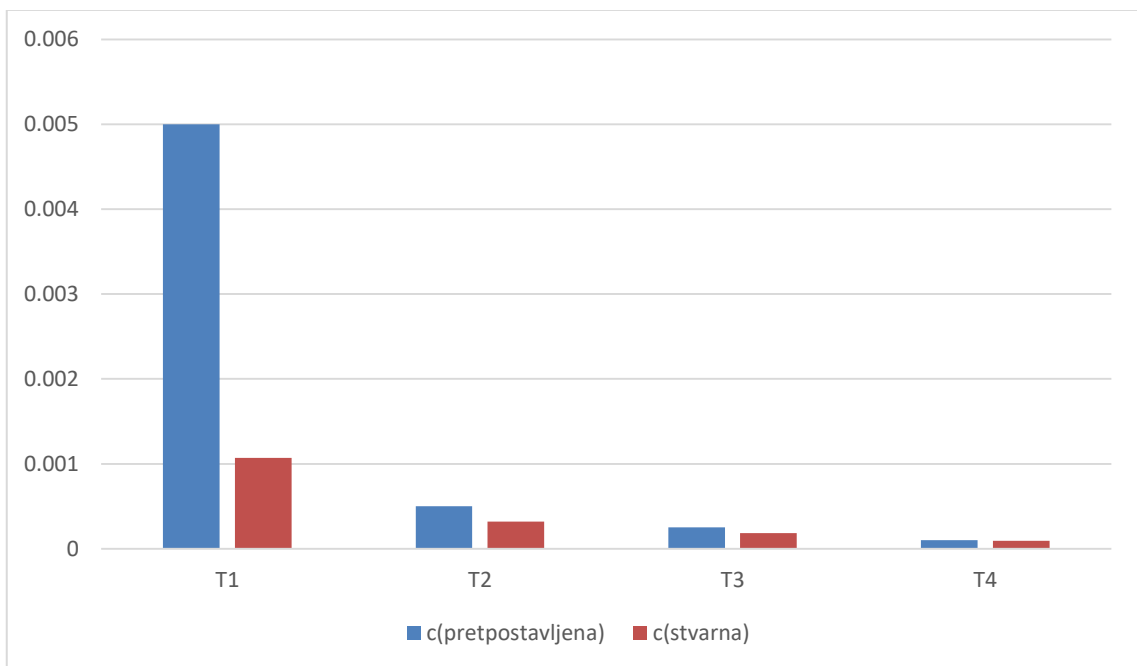
$$\text{za otopinu T}_2: c = \frac{0,463+0,0875}{1720,8} = 3,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$\text{za otopinu T}_3: c = \frac{0,228+0,0875}{1720,8} = 1,83 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$$

$$\text{za otopinu T}_4: c = \frac{0,074+0,0875}{1720,8} = 9,39 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

## 4. RASPRAVA

U ovom radu cilj je bio odrediti koncentraciju željezovih(III) iona u farmaceutskom pripravku Tardyferon, koji se koristi u liječenju anemije. Mjerenje apsorbancije željezovih iona u kompleksu sa sulfosalicilnom kiselinom vršilo se UV/VIS metodom, a za izračun koncentracije preko Beerovog zakona. Četiri uzorka (T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>) pripremljeni su mikrovalnom razgradnjom. Iz eksperimentalnih podataka očitano je maksimum apsorbancije ljubičastog kompleksa željezovih(III) iona i sulfosalicilne kiseline pri 506 nm. Pretpostavljene pripravljene koncentracije iz četiriju pripremljenih otopina uspoređene su s stvarnim, izračunatim Beerovim zakonom iz eksperimentalnih podataka. Iz priloženog grafa se vidi njihov odnos.



**Slika 13.** Usporedba koncentracija Fe<sup>3+</sup> iona u pripremljenim otopinama s onim stvarnim dobivenim u eksperimentu

Pretpostavljeno je da je u Tardyferonu T<sub>1</sub> koncentracija željezovih iona  $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , što je i prema deklaraciji tableta (80 mg u tableti). S obzirom na apsorbanciju na T<sub>1</sub> prema krivulji umjeravanja Beerovim zakonom, tj. prema jednadžbi pravca izračunata je znatno manja koncentracija željeza od pretpostavljene u iznosu od  $1,07 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .



Razrjeđenjem otopine  $T_1$  dobivena je otopina  $T_2$  pretpostavljene koncentracije  $5 \cdot 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ , no u eksperimentu je prema krivulji umjeravanja dobiveno  $3,2 \cdot 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ , nešto manja koncentracija od očekivane. U otopini Tardyferona  $T_3$  je pretpostavljena koncentracija od  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ , a eksperimentalno je utvrđeno da se u otopini nalazi  $1,83 \cdot 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$  željezovih iona, što je neznatno manje od očekivane. Daljnjim razrjeđenjem pripravljena je otopina  $T_4$  koncentracije  $1 \cdot 10^{-4}$  mol  $L^{-1}$ , eksperimentalnim mjerenjem određeno je da otopina sadrži skoro pa jednaku količinu željezovih iona,  $9,39 \cdot 10^{-5}$  mol  $L^{-1}$ .

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu izvršenih mjerenja i dobivenih rezultata u ovom radu mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Sulfosalicilna kiselina gradi stabilan kompleks sa željezovim(III) ionima pri  $\text{pH}=1$  i  $t=25^\circ\text{C}$
- Nastali kompleks ljubičastog obojenja može se koristiti za kvantitativno određivanje željezovih(III) iona analizom spektra pri valnoj duljini 506 nm
- Spektrofotometrijsko određivanje željeza može se koristiti za mjerenje ukupne količine željeza u farmaceutskom pripravku Tardyferon prethodno raščinjen u mikrovalnoj pećnici
- Dobivena koncentracija u prvoj otopini,  $T_1$ , ne podudara se sa koncentracijom proizvođača, točnije nema toliko željeza u tableti kao što piše na deklaraciji. Razlog tome može biti da se svo željezo nije otopilo mikrovalnom digestijom ili lijek stvarno ne sadrži količinu željeza navedenu na deklaraciji. Ostale otopine dobivene su razrjeđenjem otopine  $T_1$  i kod njih nema značajnijeg odstupanja kao u slučaju prve otopine.

## 6. LITERATURA

1. S. Lipanović, I. Filipović, *Opća i anorganska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1995.-1
2. <https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/zeljezo.pdf> (5.8.2020)
3. Lavon J. Dunne, *Sve o zdravoj prehrani*, MATE, Zagreb, Hrvatska, 1996.
4. Brozović M., Suvremeni farmaceutski oblici željeza za oralnu i parenteralnu primjenu, specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2018. <https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma%3A1056/datastream/PDF/view> (5.8.2020)
5. [https://hr.iliveok.com/health/tardiferon\\_127590i15828.html](https://hr.iliveok.com/health/tardiferon_127590i15828.html)(6.8.2020)
6. V. Martinez, *UV/VIS i IR spektroskopija organskih molekula*, završni rad, Prirodoslovno- matematički fakultet, Zagreb, 2017.
7. M. Tomljanović, *Instrumentalne kemijske metode*, I. dio, U. G. HIJATUS, Zenica, 2000.
8. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, šesto izdanje(englesko), prvo izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 1999.
9. M. Radetić, *Spektrofotometrijsko određivanje bakra i salicildoksima u uzorcima čaja od mente*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2012.
10. <http://butane.chem.uiuc.edu/pshapley/GenChem2/A3/3.html> (7.8.2020)
11. <http://eskola.chem.pmf.hr/udzbenik/u102/index.html> (8.8.2020)
12. P. W. Atkins & M. J. Clugston , *Načela fizikalne kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1989.
13. P. Bajt, *Lambert-Beerov zakon*, završni rad, Sveučilište J.J Strossmayera u Osijeku, Osijek, hrvatska, 2018.
14. B. Brbora, *Spektrofotometrijsko određivanje konstante stabilnosti kompleksa bakra i salicilaldoksima u kiselom mediju*, završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, Hrvatska, 2012.
15. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=4486> (8.8.2020)
16. I. Golubić, *Atomska apsorpcijska spektroskopija u analizi uzorka vode*, završni rad, Geotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Varaždin, Hrvatska, 2017
17. [https://docplayer.rs/146672379-2\\_predavanje-kim-km-asperger-danijela-compatibility-mode.html](https://docplayer.rs/146672379-2_predavanje-kim-km-asperger-danijela-compatibility-mode.html) (9.8.2020.)

18. [https://www.fkit.unizg.hr/\\_download/repository/Nastavni\\_tekst\\_Molekulska\\_spektroskopija.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf) (9.8.2020.)
19. [https://files.mtstatic.com/site\\_4334/8477/0/webview?Expires=1597001108&Signature=AkbN3ENrlxSuzR0e5whf2465n0f0h4BnycSE2lbtayT7kS5woH0DTwZqhKCoKxE0cYCR3MZ4Qbp~MdlhlPLGVBTW2WKiiR6idwsaeUPdb9xXCiCbkSkECc~FFjRTHlSkM243gvDXMM4Cdxyt7negVdrVgLzZBHYCHYCbeSXsDmI\\_&Key-Pair-Id=APKAJ5Y6AV4GI7A555NA](https://files.mtstatic.com/site_4334/8477/0/webview?Expires=1597001108&Signature=AkbN3ENrlxSuzR0e5whf2465n0f0h4BnycSE2lbtayT7kS5woH0DTwZqhKCoKxE0cYCR3MZ4Qbp~MdlhlPLGVBTW2WKiiR6idwsaeUPdb9xXCiCbkSkECc~FFjRTHlSkM243gvDXMM4Cdxyt7negVdrVgLzZBHYCHYCbeSXsDmI_&Key-Pair-Id=APKAJ5Y6AV4GI7A555NA) (9.8.2020)
20. A.M. Dizdar, *Mikrovalna i ultrazvučna digestija pepela i krutih goriva*, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, Hrvatska, 2012.